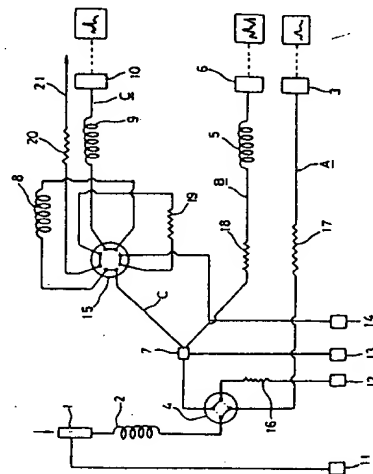


(54) METHOD AND APPARATUS FOR ANALYZING HYDROCARBONS

(11) 3-128458 (A) (43) 31.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-267222 (22) 13.10.1989
 (71) TOSOH CORP(1) (72) KATSUYOSHI OKA(4)
 (51) Int. Cl.⁴. G01N30/88, G01N30/46

PURPOSE: To shorten the time for analysis by introducing the P and N components (paraffinic and naphenic hydrocarbons) discharged from a 1st column into a 2nd column, making individual sep'n. and analyses, introducing the components into 3rd, 4th columns and separating and analyzing the isoparaffinic hydrocarbon in the N and P components with gas chromatography.

CONSTITUTION: The P and N components are rapidly discharged from the column 2 and are introduced into gas flow passage B, C via a selector valve 4 when a naptha sample is introduced into the column 2. The components are then subjected to the parallel sep'n. and analysis. The component A (arom. hydrocarbon) is held in the column 2 and is gradually separated. The fraction of the component A is introduced via the valve 4 into a detector 3 where the component A is analyzed. The P and N components are supplied via a branch pipe 7 to the gas flow passages B, C. The P and N components introduced into the flow passage B are analyzed by a detector 6 via the column 5. The P and N components introduced into the flow passage C are introduced via a selector valve 15 into the column 8. The isoparaffin in the P component and the N component are separated by the column 9 and are detected by a detector 10.

**(54) QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIGEN AND SOLID PHASE USED THEREIN**

(11) 3-128460 (A) (43) 31.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 65-70341 (22) 20.3.1990 (33) JP (31) 89p.167697 (32) 29.6.1989
 (71) NIPPON SHOJI K.K. (72) YOJI MARUI(7)
 (51) Int. Cl.⁴. G01N33/543, G01N33/53, G01N33/563

PURPOSE: To quantitatively determine the antigen existing in a sample with a high sensitivity by conjugating a biotin deriv. with the thiol group of the Fab' fragment of an antibody and conjugating avidin via a biotinated high-polymer material to the solid phase.

CONSTITUTION: The biotininated antibody formed by conjugating the biotin deriv. with the thiol group of the Fab' fragment of the antibody, an enzyme labeled antibody and the solid phase immobilized with one kind selected from the avidin and streptavidin which can react specifically with the biotin deriv. and the deriv. thereof are used in an enzyme immunoassay of the antigen by a solid phase method. The one kind selected from the avidin and streptavidin which can react specifically with the biotin deriv. and the deriv. thereof is conjugated with the high-polymer material conjugated via the biotin deriv. to the solid phase, by which the antigen existing in the sample is determined with the high sensitivity.

(54) METHOD FOR MEASURING ANTIBODY

(11) 3-128462 (A) (43) 31.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 65-162056 (22) 20.6.1990 (33) JP (31) 89p.195968 (32) 28.7.1989
 (71) MITSUBISHI KASEI CORP (72) MICHIO ITO(2)
 (51) Int. Cl.⁴. G01N33/543, G01N33/53, G01N33/553

PURPOSE: To measure the quantity of antibodies with a high sensitivity by agglutinating antigen-deposited insoluble carrier particles and magnetic material-contg. particles via the antibodies to the antigens in a sample and applying a magnetic field thereto separate the unreacted magnetic material-contg. particles and the agglutinated matter, then visually or optically detecting the quantity of the remaining unreacted antigen-deposited insoluble carrier particles.

CONSTITUTION: The insoluble carrier particles, such as cells, gelatin particles, org. high-polymer materials or inorg. fine particles, on which the antigens are deposited, are used as a 1st reagent. The magnetic material-contg. particles, such as polysaccharides and protein, deposited with materials which can specifically react with immune globulin classes, such as IgG and IgA, are used as a 2nd reagent. The sample considered to contain the antibodies to the antigens is then brought into reaction with the 1st, 2nd reagents in the same reaction system to cause the agglutination of the antigen-deposited insoluble carrier particles and the magnetic material-contg. particles via the antibodies to the antigens existing in the sample. The magnetic field is thereafter applied to the sample to separate the unreacted magnetic material-contg. particles and the agglutinated matter thereof. The quantity of the remaining unreacted antigen-deposited insoluble carrier is then visually or optically detected.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-128460

⑬ Int. Cl.⁵

G 01 N 33/543
33/53
33/543

識別記号

C
U
Q

庁内整理番号

7906-2G
7906-2G
7906-2G※

⑭ 公開 平成3年(1991)5月31日

審査請求 未請求 請求項の数 14 (全17頁)

⑮ 発明の名称 抗原の定量法およびそれに用いる固相

⑯ 特 願 平2-70341

⑰ 出 願 平2(1990)3月20日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)6月29日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-167697

㉑ 発 明 者	丸 井	洋 二	兵庫県宝塚市小林5丁目4-41
㉒ 発 明 者	林	長 蔵	兵庫県西宮市高畑町1番2-610
㉓ 発 明 者	伊 藤	重 喜	大阪府三島郡島本町若山台2-2 22-202
㉔ 発 明 者	藤 尾	美 恵 子	大阪府茨木市丑寅2丁目7-23 ソロ南茨木306
㉕ 発 明 者	田 中	裕 樹	大阪府大阪市東住吉区杭全8-12-3
㉖ 発 明 者	長 崎	敏 秀	兵庫県宝塚市花屋敷荘園1丁目5-1
㉗ 発 明 者	宗 田	靖 二	兵庫県神戸市東灘区本山北町4-5-11
㉘ 出 願 人	日本商事株式会社		大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号
㉙ 代 理 人	弁理士 青 山 葆		外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

抗原の定量法およびそれに用いる固相

2. 特許請求の範囲

(1) 固相法による抗原の酵素免疫測定法において、
ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチ
オール基に結合させたビオチン化抗体、酵素標識
抗体、および上記ビオチン誘導体と特異的に反応
し得るアビジン、ストレプトアビジンおよびそれ
らの誘導体から選ばれる1種を固定化させた固相
を用いることを特徴とする方法。
(2) 固相が、ビオチン誘導体に特異的に結合した
アビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘
導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介
して、固相に結合した高分子物質に結合させるこ
とにより、固相に固定化させたものである請求項
(1)記載の方法。
(3) ビオチン化抗体と酵素標識抗体を試料中の測
定すべき抗原と反応させてビオチン化抗体/抗原
/酵素標識抗体複合体を生成させ、ついでこの複

合体を、固相に固定化したアビジン、ストレプト
アビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種
と反応させることを特徴とする請求項(1)または
(2)記載の方法。

(4) ビオチン化抗体、酵素標識抗体、測定すべき
抗原を含有する試料および固相を同時に反応させ
て行う請求項(1)または(2)記載の方法。

(5) 固相法による抗原の酵素免疫測定法において、
ビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗
体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビ
ジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体
から選ばれる1種を介して、固相に固定化させた
固相、および酵素標識抗体を用いることを特徴と
する方法。

(6) 固相が、ビオチン誘導体とビオチン化抗体と
に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジ
ンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該
ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子
物質に結合させることにより、固相に固定化させ
たものである請求項(5)に記載の方法。

- (7) ビオチン化抗体が、ビオチン誘導体を抗体の F_{ab}' フラグメントのチオール基に結合させたものである請求項(5)または(6)に記載の方法。
- (8) 酵素標識抗体、測定すべき抗原を含有する試料および固相を同時に反応させて行う請求項(5)、(6)または(7)に記載の方法。
- (9) ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化させたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相。
- (10) 高分子物質がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、イムノグロブリン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン、プルランおよびデキストランよりなる群から選ばれたものである請求項(9)に記載の固相。
- (11) ビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの

誘導体から選ばれる1種を介して、固相に固定化させたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相。

(12) ビオチン誘導体とビオチン化抗体とに特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に結合させたものである請求項(11)に記載の固相。

(13) ビオチン化抗体が、ビオチン誘導体を抗体の F_{ab}' フラグメントのチオール基に結合させたものである請求項(11)または(12)に記載の固相。

(14) 高分子物質がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、イムノグロブリン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン、プルランおよびデキストランよりなる群から選ばれたものである請求項(12)または(13)に記載の固相。

3. 発明の詳細な説明 (産業上の利用分野)

本発明は、試料中の抗原の定量法およびそれに用いる固相に関する。さらに詳しくは、試料中の抗原にビオチン化抗体、酵素標識抗体およびアビジン固定化固相を反応させるか、または酵素標識抗体およびビオチン化抗体結合アビジン固定化固相を反応させて、アビジン固定化固相上にビオチン化抗体/抗原/酵素標識抗体の複合体を生成させ、固相の酵素活性を測定することにより抗原を定量する免疫分析法、およびそれに用いる固相に関する。

(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

近年、医療分野において癌マーカーやホルモン等の微量物質の測定が重要になってきている。このような微量物質の測定には高い特異性と感度が要求されるため、そのような特異性および感度を満たすものとして抗原抗体反応を利用した免疫学的方法が広く用いられている。現在知られている免疫学的測定法としては、蛍光抗体法、ラジオイムノアッセイ法、酵素標識免疫測定法などがあるが、なかでも標識物質として酵素を用いた酵素標

識免疫測定法が、適用範囲の広さ、試薬の扱い易さ、試料を大量に処理できること等の利点があるため微量物質測定の主流になりつつある。

抗原を定量するための酵素免疫測定法では、試料中の抗原と反応した酵素標識抗体と未反応の酵素標識抗体とを分離(以下、「B/F分離」という)するために、これらの標識抗体をさらに固相上に固定化させた抗体と抗原抗体反応させて結合させ、固相上に結合した酵素を測定するサンドイッチアッセイ法が一般に用いられている。しかしながら、このようなB/F分離における固相上の抗原抗体反応は平衡化に長時間を要し、測定に時間がかかるため、短時間で測定結果を得ることが望ましい臨床化学分野では不都合である。そこで、近年、固相上での反応を速く行うために、抗原抗体反応の代わりにアビジン-ビオチン等の特異的反応をB/F分離に利用することが考えられている。

従来より免疫学的手法にアビジン-ビオチンの特異的結合を応用した例としては、たとえばアンダーソン(A. Anderson, G. W.)らの J. A. Ser. Chem.

Soc. 86:1839(1964)などに記載されているような組織化学の分野での利用がよく知られている。これは、たとえば組織上の抗原にビオチン標識抗体を結合させ、さらにアビジン標識酵素を反応させて組織上に抗体/ビオチン/アビジン/酵素複合体を生成させ、この酵素反応の生成物から組織上の抗原部位を確認するものである。しかしながら、この方法では試料中の抗原を定量することはできない。

臨床化学分野においてB/F分離にアビジン-ビオチン反応を利用する方法は、特開昭63-229368号明細書に記載がある。この方法は、たとえば、測定しようとする抗体と標識抗原、ビオチン化抗原およびアビジン固定化固相を反応させて固相上にアビジン/ビオチン化抗原/抗体/標識抗原複合体を生成させ、標識を測定して抗体を定量しようとするものである。

一方、抗原を測定する方法は、アビジン固定化固相に、ビオチン化抗体および放射性物質標識抗体を用いたフェリチン測定試薬として日本メジファ

こと、さらにアビジンが固相に結合しにくい固相上のアビジン量が不足していることが考えられ、本質的な感度不足の解消はなされていない。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、上記方法における感度不足を解消するため、すなわち抗体価を損なうことなくビオチン化抗体を調製し、固相上のアビジン結合量を多くするための手段を開発するために鋭意研究を重ねた結果、第一の課題は抗体のFab'フラグメントのチオール基にビオチン誘導体を結合させることにより、第二の課題はビオチン化高分子物質を介してアビジンを固相に結合することにより解決され、感度が上昇すること、さらにこの両方の手段を併用すれば感度がさらに上昇すること、また、通常のビオチン化抗体およびアビジン固定化固相であっても、該ビオチン化抗体をアビジン固定化固相に結合させたビオチン化抗体結合アビジン固定化固相を用いることにより、通常のアビジン固定化固相に比べて高い感度が得られること、さらに、この方法では酵素標識抗体のみを加える

ジックス(株)から市販されている。しかしながら、この試薬を用いた方法では反応時間が長くなる(3~4時間)。また、第28回日本臨床化学学会年會(1988年11月18日、19日)プログラム要旨集一般演題No. 41にも同様の報告がある。この方法は、測定しようとする抗原を含む試料に標識抗体およびビオチン化抗体を加え、液相中で抗原抗体反応を行った後にアビジン固定化固相を加え、酵素標識抗体/抗原/ビオチン化抗体からなるサンドイッチ複合体を固相に吸着させ、ついで酵素活性を測定して抗原を定量するものである。

この方法では、抗原抗体反応は液相中で進行するため速く平衡化し、さらに固相上のアビジン-ビオチン反応も固相上の抗原抗体反応に比べて速く進行するため、反応時間が短縮される。しかしながら、この方法では、酵素反応に要する時間を約10分間と短くするために、蛍光基質を用いて感度不足の解消を図っているが、ビオチン化抗体として抗体のアミノ基にビオチン誘導体を結合したものをを用いているため抗体価が損なわれている

だけで抗原を測定できるため操作が簡便であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の目的は、固相法による抗原の酵素免疫測定法において、ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチオール基に結合させたビオチン化抗体、酵素標識抗体、および上記ビオチン誘導体と特異的に反応し得るアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を固定化させた固相を用いることを特徴とする方法(方法1);および固相法による抗原の酵素免疫測定法において、ビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を介して、固相に固定化させた固相、および酵素標識抗体を用いることを特徴とする方法(方法2)を提供することにある。

本発明の他の目的は、固相が、ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該

ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化されたものである上記方法1、ビオチン化抗体と酵素標識抗体を試料中の測定すべき抗原と反応させてビオチン化抗体/抗原/酵素標識抗体複合体を生成させ、ついでこの複合体を、固相に固定化したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種と反応させることを特徴とする上記方法1、ビオチン化抗体、酵素標識抗体、測定すべき抗原を含有する試料および固相を同時に反応させて行う上記方法1、固相が、ビオチン誘導体とビオチン化抗体とに特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化されたものである上記方法2、ビオチン化抗体が、ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチオール基に結合させたものである上記方法2、さらに酵素標識抗体、測定すべき抗原を含有する試料および固相を同時に反

たはそれらの誘導体が固相上に固定化されたものである。また、本発明固相2は、ビオチン化抗体を本発明固相1に結合させるか、またはアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を直接固相に固定化した固相に結合させたものである。

本発明固相1を調製するには、たとえば、ビオチン誘導体(以下、「ビオチン化試薬」ともいう)を用いてビオチン化した高分子物質を、高分子物質の部位で固相に結合させ、ビオチン部位にさらにアビジン、ストレプトアビジンまたはこれらの誘導体(たとえば、あらかじめ遊離のアミノ基を無水酢酸によりアセチル化するなどしてブロックした中性化アビジン等)を結合させればよい。高分子物質の固相への結合方法としては、物理的吸着法、共有結合法等が挙げられる。また、本発明固相2を調製するには、本発明固相1、またはアビジン、ストレプトアビジンまたはこれらの誘導体を直接固定化した固相に、通常のビオチン化抗体またはビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメン

トさせて行う上記方法2を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化されたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相(本発明固相1);およびビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を介して、固相に固定化されたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相(本発明固相2)を提供することにある。

本発明固相1は、高分子物質がビオチン化され、そのビオチン部分にアビジンが結合した高分子物質/ビオチン/アビジン複合体が、固相上に固定化されていることを特徴とし、ビオチン化高分子物質を介してアビジン、ストレプトアビジン、ま

トのチオール基に結合させたビオチン化抗体を結合させればよい。

本発明に使用する高分子物質は、ビオチン化試薬と反応することのできる官能基を有し、かつ固相に物理的吸着または共有結合することができるものであればよい。具体的には、ウシ血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン(OA)、イムノグロブリン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン等の蛋白、デキストラン、プルラン等の多糖類等を挙げることができる。

本発明に使用するビオチン化試薬は、高分子物質と反応して共有結合することができる官能基を有するビオチン誘導体であって、たとえば、ビオチン-N-ヒドロキシサクシニイミドエステル(NHS-ビオチン)、N-ビオチニル-6-アミノカプロイル-N-ヒドロキシスルホサクシニイミドエステル(NHS-LC-ビオチン)、スルホサクシニイミジル-2-(ビオチンアミド)エチル-1,3-ジチオプロピオネート(NHS-SS-ビオチン)などが挙げられる[Analytical Bio

chemistry: 171、1-32(1988)参照]。

ビオチン化試薬と高分子物質とを結合させるには、ビオチン化試薬および高分子物質の種類に依存するが、高分子物質1モルに対しビオチン化試薬1〜100モル程度を使用することが好ましい。反応は、高分子物質とビオチン化試薬が十分に結合し、高分子物質上の固相との結合部位が失活しないような条件下で行い、たとえば、溶液のpHは4〜10程度、反応温度は4〜45℃程度、反応時間は10分〜24時間程度で行えばよい。

固相とビオチン化高分子物質との結合は、通常の方法(物理的吸着法、共有結合法など)により行うことができ、結合後にアビジン、ストレプトアビジンまたはそれらの誘導体の結合が阻害されない方法であればよい。たとえば、物理的吸着法としては、ビオチン化高分子物質の溶液(1〜1000 μ g/ml)中に固相を浸漬する方法、共有結合法としては、ビオチン化高分子物質の溶液(1〜1000 μ g/ml、pH 5〜7)を、カルボキシル基を有する固相を1-エチル-3-(3-ジメチ

ルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩の溶液(5〜200 μ g/ml)で1〜24時間処理したものと反応させる方法などが挙げられる。

最後にアビジン、ストレプトアビジンまたはこれらの誘導体の溶液(1〜1000 μ g/ml)中に上記ビオチン化高分子物質の結合した固相を1〜20時間浸漬すれば本発明固相1が得られる。

本発明固相2は、本発明固相1、またはアビジン、ストレプトアビジンまたはこれらの誘導体の溶液(1〜10000 μ g/ml)中に固相を1〜20時間浸漬して得た固相を、さらにビオチン化抗体の溶液(1〜1000ピコモル/ml)中に1〜20時間浸漬することにより調製することができる。

本発明固相1および2に使用する固相物質としては、複合体を安定に固定でき、洗浄や測定に適した形状を有するものであればよく、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ガラス、セラミック、アガロース等からなるビーズ、プレート、試験管、ラテックス等、酵素免疫測定法に通常用いるものを使用することができる。

本発明はさらに、ビオチン化抗体、酵素標識抗体、およびアビジン、ストレプトアビジンまたはそれらの誘導体を固定化した固相を用いた抗原のサンドイッチアッセイ法において、ビオチン化抗体として抗体のFab'フラグメントのチオール基にビオチン誘導体を結合させたものを用いることを特徴とする方法をも提供する。このようなビオチン化抗体は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体から既知の方法、たとえば純生化学実験講座5免疫生化学研究法(東京化学同人、1986)89〜112頁記載の方法によりFab'フラグメントを得、ついで、このFab'フラグメントのチオール基にビオチン誘導体を結合させることにより調製することができる。

この場合のビオチン誘導体は、チオール基と反応する官能基(たとえば、ヨードアセチル基またはマレイミド基)を有するビオチン化試薬であり、その例示としては、N-ヨードアセチル-N-ビオチニルヘキシレンジアミン、3-(N-マレイミドブチリル)-ビオシチン(MBB)、3-(N-

マレイミドプロピオニル)-ビオシチン、3-(N-マレイミドカプロイル)-ビオシチン、N-ビオチニル-N-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド等が挙げられる。

上記結合反応におけるFab'フラグメントとビオチン化試薬の使用量はビオチン化試薬の種類によって異なるが、フラグメント1モルに対してビオチン化試薬5〜20倍モル程度を使用すればよい。反応は、Fab'フラグメントとビオチン化試薬が十分に結合し、抗体価が失活しないような条件下で行い、たとえば、溶液のpHは6〜7程度、反応温度は4〜40℃程度、好ましくは20〜30℃程度、反応時間は1〜24時間程度で行えばよい。

かくして得られたビオチン化抗体を用いて抗原定量を行うには、試料(1〜100 μ l、好ましくは5〜50 μ l)に上記ビオチン化抗体および酵素標識抗体の混合液(50〜1000 μ l、好ましくは100〜500 μ l)を加えて反応させ、ビオチン化抗体/抗原/酵素標識抗体複合体を生成させ

た後にアビジン固定化固相を加えてさらに反応させる。本反応は、試料、ビオチン化抗体、酵素標識抗体およびアビジン固定化固相を1工程で加えて、上記2反応を同時に行うこともできる。この場合、使用するアビジン固定化固相としては、固相に前記アビジン類を直接固定化した公知の固相(ベクター社製固定化アビジンDや特開昭63-229368号など)のほか、前記本発明の固定化固相1が用いられ、本発明の固定化固相1ではより安定した抗原測定が可能であるため好ましい。

また、上記で調製したビオチン化抗体または通常のビオチン化抗体をあらかじめアビジン固定化固相に結合させた本発明固相2を用いる場合には、該固相に、試料(1~100 μ l、好ましくは5~50 μ l)および酵素標識抗体溶液(50~100 μ l、好ましくは100~500 μ l)を加えて反応させ、該固相上に抗原/酵素標識抗体複合体を生成させる。

上記の反応における反応時間は、本発明固相1を用いる場合には、抗原抗体反応およびアビジン

常の酵素、たとえば、 β -D-ガラクトシダーゼ(β -Gal)、ペルオキシダーゼ(POD)、アルカリホスファターゼ(ALP)等を用いることができる。固相上の酵素活性の測定は、基質として、標識酵素が β -Galの場合はオルト-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド等を、PODの場合は過酸化水素と2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン、過酸化水素とo-フェニレンジアミン等を、ALPの場合はパラ-ニトロフェニルリン酸、(4-メチル)ウンベリフェリルリン酸等を反応系に適量に加え、比色法や蛍光法等の常法により測定する。

本発明の方法によれば、ヒト血清、血漿、尿等の試料中に存在する抗原の定量を高感度で行うことができ、アッセイ時間も極めて短時間で済む。上記方法に本発明固相を用いれば、感度がさらに向上し、一層適切なアッセイを行うことが可能と

る。ビオチン反応とも1~20分、好ましくは5~15分程度でよい。同時に反応させる場合は、1~30分、好ましくは5~20分程度反応させればよい。また、本発明固相2を用いる場合には、抗原抗体反応を1~30分、好ましくは5~20分程度行えばよい。反応後に固相を洗浄し、基質溶液(50~1000 μ l、好ましくは100~500 μ l)を加え、比色測定では1~30分、好ましくは5~20分間、蛍光測定では15秒~15分、好ましくは1~5分間酵素反応させる。反応後に反応液をそのまま、または適量の反応停止液を加えた後に比色または蛍光測定する。あらかじめ濃度既知の抗原を用いて検量線を作成しておき、これから試料中の抗原濃度を測定する。

上記反応はいずれも10~45℃、好ましくは20~40℃で行う。またビオチン-アビジン反応および抗原抗体反応時のpHは5~9、好ましくは中性付近で、酵素活性測定時のpHは用いた標識酵素の至適pH付近である。

標識酵素としては、酵素免疫測定法に用いる通

なる。

つぎに本発明を実施例に基づいてさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

実施例1 [ビオチン化抗体(ビオチン-Fab')の調製]

(a)抗アルファ-フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体の調製:

AFPで免疫したBALB/Cマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞FOを用い、ポリエチレングリコール法によりハイブリドーマを作製し、得られたハイブリドーマを限界希釈法により2回クローニングし、抗AFPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマNHAFP-14を得た。このハイブリドーマをASF培地103で培養し、その培養上清をプロテインA-アガロースカラムを用いて抗AFPモノクローナル抗体(MNHAFP-14)を精製した。

(b) Fab'の調製:

上記工程(a)で得た抗AFPモノクローナル抗

体(MNHAFP-14; 10 mg/2 ml)液を0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2)にて透析し、これにペプシン溶液(ペーリンガー・マンハイム社製; 20 mg/ml 0.1 M酢酸緩衝液; 100 μl)を加え、37℃で20時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファクリル-S-200カラム(直径1.5 cm×50 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0)にかけ、F(ab')₂分画を得た。このF(ab')₂分画に2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を濃度が10ミリモル/lになるように加え、37℃で1時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファクリル-S-200カラム(直径1.5 cm×50 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0)にかけ、F(ab')₂分画を得た。

(c) ビオチン化抗体(ビオチン-Fab')の調製:

Anal. Biochem. 149, 529~536 (1985) 記載の方法に従い、3-(N-マレイミドブチリル)-ビオシチン(MBB)を合成し、Fab'(1.66 mg/1.3 ml)にMBB溶液(0.5 mg/ml 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0; 0.5 ml)を加え、室

温で2時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファデックス-G-25カラム(直径1.5 cm×30 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0)にかけ、POD-マレイミド分画を得た。

(d) POD-Fab'の調製:

Fab'(1 mg)に対してPOD-マレイミド(1 mg)を加え、冷所にて20時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファクリル-S-200カラム(直径1.5 cm×50 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.5)にかけ、POD-Fab'分画を得た。

製造例(従来のアビジン固定化固相の調製)

アビジン(和光純薬(株)製、生化学用、5 mg)を20 mM炭酸緩衝液(pH 9.6、0.15 M塩化ナトリウム含有、10 ml)に溶解し、得られた溶液中にポリスチレンビーズ(住友ベークライト(株)製、Cタイプ)約30個を入れ、室温にて20時間放置し、固相にアビジンを吸着させた。この固相を生理食塩水で数回洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン(BSA)(0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.0)溶液中に浸し、室温にて20時間放置し、ア

ビスン固定化固相を得た。

実施例2[酵素標識抗体(POD-Fab')の調製]

(a) 抗AFPモノクローナル抗体の調製:

実施例1(a)と同様の手順に従い、抗AFPモノクローナル抗体(MNHAFP-18)を得た。

(b) Fab'の調製:

上記工程(a)で得た抗AFPモノクローナル抗体(MNHAFP-18)を用い、実施例1(b)と同様の手順に従い、Fab'を得た。

(c) POD-マレイミドの調製:

POD(ペーリンガー・マンハイム社製; 6 mg)を0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0; 0.8 ml)に溶解し、これにN-(γ-マレイミドブチリルオキシ)サクシンイミド(同仁化学(株)製)液(80 mg/ml N,N'-ジメチルホルムアミド; 50 μl)を加え、30℃で1時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファデックス-G-25カラム(直

径1.5 cm×30 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0)にかけ、POD-マレイミド分画を得た。

実施例3(ビオチン-Fab'を用いたAFPの定量

(2工程法))

ヒトAFP(ダコ社製)をAFPを含まないヒト血清に溶解し、AFP濃度を0~1000 ng/mlに調整したものを試料とし、この試料(50 μl)を試験管に取り、これに抗体液[Fab'濃度が160 μg/mlのビオチン-Fab'(50 μl)およびPOD活性が26.1 IU/mlのPOD-Fab'(500 μl)に10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0、0.15 M塩化ナトリウム、0.5% BSA含有)を加え全量を10 mlにしたもの](400 μl)を加え、37℃で10分間加温した。ついで、反応液に製造例で調製したアビジン固定化固相を加え、37℃で10分間加温した。反応後、反応液を吸引除去し、洗浄液(生理食塩水)(2 ml)を加え、攪拌し、洗浄液を吸引除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。洗浄後、基質液(ABTS 1 mg/ml、0.01%過酸化水素、0.1 Mクエン酸緩衝液pH 4.2)(500 μl)を加え、37℃で15分

間反応させた後、反応停止液として5mMアジ化ナトリウム液(2μl)を加え、415nmにおける吸光度を測定した。その結果を第1図の●に示す。

実施例4(ビオチン-Fab'を用いたAFPの定量(1工程法))

上記実施例3で調製した試料(50μl)を試験管に取り、製造例で調製したアビジン固定化固相を加え、さらに実施例3と同じ抗体液(400μl)を加え、37℃で10分間加温した。反応後、反応液を吸引除去し、実施例3と同じ洗浄液(2μl)を加え、攪拌し、洗浄液を吸引除去した。この洗浄操作をさらに2回繰り返した。洗浄後、実施例3と同じ基質液(500μl)を加え、37℃で15分間反応させた後、実施例3と同じ反応停止液(2μl)を加え、415nmにおける吸光度を測定した。その結果を第1図の▲に示す。

比較例1

実施例3におけるビオチン-Fab'の代わりに抗体のアミノ基にビオチン誘導体を結合させたビオチン化抗体[抗AFPモノクローナル抗体液(M

0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0、1μl)に溶解し、これにNHS-SS-ビオチン溶液(ピアス社製、16.8μg/μl 0.1Mリン酸緩衝液pH7.0:1μl)を加え、30℃で1時間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファデックス-G-25カラム(直径1.5×30cm、溶出液:50mM炭酸緩衝液pH9.6)にかけ、ビオチン-BSA分画を得た。

(b)本発明固相1の調製:

上記工程(a)で得たビオチン-BSAを50mM炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、ビオチン-BSA濃度を10μg/μlに調整した。この液(100μl)をプレート(メンコ社製、イムノプレート1、96穴)のウェルに分注し、室温にて1時間反応させて固定化した。ウェルを生理食塩水で数回洗浄した後、アビジン溶液(ベクター社製、アビジンD、50μg/μl 0.1Mリン酸緩衝液pH7.0:100μl)をウェルに分注し、37℃で1時間反応させた。ウェルを生理食塩水で数回洗浄した後、3%BSA溶液(50mM炭酸緩衝液pH9.6

NHAFP-14:2.5μg/μl 0.1Mリン酸緩衝液)にNHS-ビオチン液(1μg/μl DMSO:300μl)を加え、30℃で1時間反応させ、反応液をセファデックス-G-25カラムで分離精製したもの]をビオチン-Fab'と同じモル濃度で用いたほかは実施例3と同様の操作を繰り返した。その結果を第1図の×に示す。

比較例2

実施例4におけるビオチン-Fab'の代わりに比較例1のビオチン化抗体をビオチン-Fab'と同じモル濃度で用いたほかは実施例4と同様の操作を繰り返した。その結果を第1図の■に示す。

第1図に示した結果から明らかなように、本発明のビオチン-Fab'を用いた方法は、従来の抗体のアミノ基にビオチン誘導体を結合させたビオチン化抗体を用いた方法に比べて感度が約2倍上昇したことがわかる。

実施例5(本発明固相1の調製)

(a)ビオチン-BSAの調製:

BSA(オリエンタル社製、F-V:30μg)を

250μl)を加え、37℃で1時間処理し、本発明固相1を得た。

実施例6(本発明固相1の調製)

(a)ビオチン-OAの調製:

OA(シグマ社製、30μg)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0、1μl)に溶解し、これにNHS-LC-ビオチン溶液(ピアス社製、12.6μg/μl 0.1Mリン酸緩衝液pH7.0:100μl)を加え、30℃で1時間反応させた。以下、実施例5工程(a)と同様の手順に従い、ビオチン-OA分画を得た。

(b)本発明固相1の調製:

上記工程(a)で得たビオチン-OAを50mM炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、10μg/μlに調整した。以下、実施例5工程(b)と同様の手順に従い、本発明固相1を得た。

実施例7(本発明固相1の調製)

(a)ビオチン-イムノグロブリンの調製:

ウサギIgGを用い、実施例1工程(b)の前半と同様の手順に従い、F(ab')₂を得た。ついで、

F(ab')₂ (10 mg/μl 0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.0; 3 μl)に、NHS-LC-ビオチン溶液(ピアス社製、15 mg/μl 0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.0; 300 μl)を加え、30℃で1時間反応させた。以下、実施例5工程(a)と同様の手順に従い、ビオチン-F(ab')₂分画を得た。さらに実施例1工程(b)の後半と同様の手順に従い、ビオチン-Fab'を得た。

(b)本発明固相1の調製:

上記工程(a)で得たビオチン-Fab'を50 mM炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈し、20 μg/μlに調整した。以下、実施例5工程(b)と同様の手順に従い、本発明固相1を得た。

実施例8 [酵素標識抗体(β-Gal-Fab')の調製]

(a) Fab'の調製:

実施例2(a)で得た抗AFPモノクローナル抗体(MNHAFP-18)を用い、実施例2(b)に記載の手順と同様にしてFab'を調製した。

(b) β-Gal-マレイミドの調製:

β-Gal(オリエンタル酵母(株)製、10 mg)を

炭酸緩衝液(pH 7.0、0.1 M塩化ナトリウム、0.2% BSA含有)を加え、全量を10 μlとしたもの; 100 μl)を加え、37℃で15分間加熱した。反応後、反応液を吸引除去し、洗浄液(生理食塩水)を加え、洗浄液を吸引除去した。この洗浄操作をさらに4回繰り返した。洗浄後、基質液[*o*-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド3.01 g/μl 50 mMリン酸緩衝液(75 mM塩化ナトリウム、0.04% MgCl₂、0.05% BSA、6% エチレングリコール含有); 100 μl)を加え、37℃で10分間反応させた後、反応停止液として1%炭酸ナトリウム(100 μl)を加えた。この液の吸光度を415 nmおよび600 nm(副波長)で測定した。その結果を第2図に●で示す。

比較例3

本発明固相1の代わりに、従来のアビジン固定化固相(実施例5においてビオチン-BSAの固定化を行わずに調製したもの)を用いた場合は実施例8と同様の操作を行った。その結果を第2図

0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0、2 μl)に溶解し、これに*o*-フェニレンジマレイミド溶液(アルドリッチ社製、25 mg/μl N,N'-ジメチルホルムアミド; 100 μl)を加え、30℃で20分間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファデックス-G-25カラム(直径1.5 cm×30 cm、溶出液: 0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.0)にかけ、β-Gal-マレイミド分画を得た。

(c) β-Gal-Fab'の調製:

Fab' (1 mg)に対してβ-Gal-マレイミド(3.9 mg)を加え、30℃で30分間反応させた。反応液を遠心分離し、上清をセファローズ-6Bカラム(直径1.5 cm×50 cm、溶出液: 10 mMリン酸緩衝液pH 6.5、0.1% BSA含有)にかけ、β-Gal-Fab'分画を得た。

実施例9 (AFPの定量)

実施例3で調製した試料(20 μl)を実施例5で調製した本発明固相1のウエルに入れ、抗体液[実施例1で調製したビオチン-Fab' (16 μg)およびβ-Gal-Fab' (20 U)に0.01 Mリン

の▲で示す。

第2図に示した結果から明らかなように、本発明固相1を用いて行った定量法では、従来のアビジン固定化固相を用いて行った定量法に比べて感度が約2倍上昇したことがわかる。

第3図には、本発明固相1を用いて測定したAFP濃度と従来の酵素免疫測定法(AFP EIA キット「三井」II; カイノス社より市販)による測定結果との相関関係を示す。図から良好な相関が得られていることがわかる。

実施例10 (AFPの定量)

実施例5で調製した本発明固相1の代わりに実施例6および7で調製した本発明固相1(ビオチン-OAおよびビオチン-Fab'を用いたもの)を用いた場合は実施例9と同様の手順に従いAFPの定量を行った。その結果を、それぞれ第4図および第5図に●で示す。また、比較例3の方法についても同様に行った。その結果を、それぞれ第4図および第5図に▲で示す。

第4図および第5図に示す結果から明らかなよ

うに、本発明固相1を用いて行った定量法では、従来のアビジン固定化固相を用いて行った定量法に比べて感度が、ビオチン-OAの場合は約1.5倍、ビオチン-Fab'の場合は約1.8倍上昇したことがわかる。

実施例11 [癌胎児性抗原(CEA)の定量]

(a) ビオチン-Fab'の調製:

抗AFPモノクローナル抗体の代わりに抗CEAモノクローナル抗体[オリエンタル酵母(株)製、MA3564F]を用いた他は実施例1と同様の操作を行い、ビオチン-Fab' (抗CEA抗体)を調製した。

(b) POD-Fab'の調製:

抗AFPモノクローナル抗体の代わりに抗CEAモノクローナル抗体(森永生科学研究所製、239-1)を用いた他は実施例2と同様の操作を行い、POD-Fab' (抗CEA抗体)を調製した。

(c) 本発明固相1の調製:

ビオチン-BSAを用いた実施例5と同様の操作に従い調製した。なお、対照として比較例3と

結果を第6図に●で示す。

また、本発明固相1の代わりに従来のアビジン固定化固相のウエルを用い、上記と同様の操作でCEAの定量を行った。その結果を第6図に▲で示す。

第6図に示した結果から明らかなように、CEAの定量においても本発明固相1を用いた方が従来のアビジン固定化固相を用いた方法に比べ感度が約1.7倍上昇したことがわかる。

(e) 相関

本発明固相1を用いた方法と従来の酵素免疫測定法(CEA・EIA II「アボット」:ダイナボット社より市販)との相関($n=20$)を調べた。その結果、相関係数 $r=0.964$ 、回帰式 $y=0.642x+2.0$ と良好な相関が得られた。

実施例12 [蛍光基質を用いたAFPの定量]

実施例9と同様の手順に従ってAFPの定量を行ったが、抗原抗体反応およびビオチン-アビジン反応は37℃で8分間、酵素反応は37℃で1分間とし、基質液としてはo-ニトロフェニル-

同様の手順も行い、従来のアビジン固定化固相も調製した。

(d) CEAの定量:

ヒトCEA(森永生科学研究所製)をCEAを含まないヒト血清に溶解し、CEA濃度が0~50 ng/ μ lの試料を調製した。上記工程(c)で調製した固相のウエルに試料(50 μ l)を入れ、抗体液[ビオチン-Fab' (10 μ g)およびPOD-Fab' (151 U)に0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0、0.1M塩化ナトリウム、0.2%BSA含有)を加え、全量を10 μ lとしたもの(100 μ l)を加え、37℃で15分間加温した。反応後、反応液を吸引除去し、洗浄液(生理食塩水)を加え、洗浄液を吸引除去した。この洗浄操作をさらに4回繰り返した。洗浄後、基質液(ABTS 1 μ g/ μ l、0.01%過酸化水素水、0.1Mクエン酸緩衝液pH 4.2:100 μ l)を加え、37℃で10分間反応させた後、反応停止液として5 μ Mアジ化ナトリウム液(100 μ l)を加えた。この液の吸光度を415 nmおよび600 nm(副波長)で測定した。その

β -D-ガラクトピラノシドの代わりに4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド(33.8 μ g/ μ l)を用い、吸光度の測定は励起波長360 nm、測定波長450 nmで行った。その結果を第7図に示す。第7図から明らかなように良好な検量線が得られた。

蛍光基質を用いることにより、実施例9の比色法に比べてより短時間に測定できることがわかる。

実施例13 (本発明固相2の調製)

実施例5工程(b)と同様の手順に従って調製した本発明固相1に、実施例1で調製したビオチン-Fab'液[1.6 μ g/ μ l(10 mMリン酸緩衝液pH 7.0、0.15 M NaCl、0.1%BSA):100 μ l]を加え、37℃で1時間反応させ処理し、AFP定量用本発明固相2を得た。

実施例14 (本発明固相2の調製)

実施例5工程(b)と同様の手順に従って調製した本発明固相1に、実施例11工程(a)で調製したビオチン-Fab'液[1 μ g/ μ l(10 mMリン酸緩衝液pH 7.0、0.15 M NaCl、0.1%BSA)

SA):100 μ l]を加え、37℃で1時間反応させ処理し、CEA定量用本発明固相2を得た。

実施例15(本発明固相2の調製)

比較例3と同様の手順に従って調製した従来のアビジン固定化固相に、実施例1で調製したビオチン-Fab'液[1.6 μ g/ μ l](10mMリン酸緩衝液pH7.0、0.15M NaCl、0.1%BSA):100 μ l]を加え、37℃で1時間反応させ処理し、AFP定量用本発明固相2を得た。

実施例16(AFPの定量)

ヒトAFP(ダコ社製)をAFPを含まないヒト血清中に溶解し、AFP濃度が0~500ng/ μ lの試料を調製した。この試料(20 μ l)を実施例13で調製した本発明固相2のウェルに入れ、さらに実施例8で調製した酵素標識抗体液[β -Gal-Fab'(20U)に0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0、0.1M塩化ナトリウム、0.2%BSA含有)を加え、全量を10 μ lとしたもの:100 μ l]を加え、37℃で15分間加温した。以下、実施例9と同様の操作に従いAFPの定量を行った。

Gal-Fab'(20U)に0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0、0.1M塩化ナトリウム、0.2%BSA含有)を加え、全量を10 μ lとしたもの:100 μ l]を加え、37℃で15分間加温した。以下、実施例9と同様の操作に従いAFPの定量を行った。その結果を第10図に●で示す。

また、従来のアビジン固定化固相を用いて比較例3と同様の操作に従ってAFPの定量を行った。その結果を第10図に▲で示す。

第10図の結果から明らかなように、本発明固相2を用いた方法が従来のアビジン固定化固相を用いた方法に比べて感度が約3.0倍上昇したことがわかる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオチン-Fab'を用いた場合とビオチン-IgGを用いた場合の感度を比較したもの、

第2図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオ

その結果を第8図に示す。

実施例17(CEAの定量)

ヒトCEA(森永生科学研究所製)をCEAを含まないヒト血清中に溶解し、CEA濃度が0~50ng/ μ lの試料を調製した。実施例14で調製した本発明固相2のウェルに試料(50 μ l)を入れ、さらに実施例11工程(b)で調製した酵素標識抗体液[POD-Fab'(15IU)に0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0、0.1M塩化ナトリウム、0.2%BSA含有)を加え、全量を10 μ lとしたもの:100 μ l]を加え、37℃で15分間加温した。以下、実施例11工程(d)と同様の操作に従いCEAの定量を行った。その結果を第9図に示す。

実施例18(AFPの定量)

ヒトAFP(ダコ社製)をAFPを含まないヒト血清中に溶解し、AFP濃度が0~1000ng/ μ lの試料を調製した。この試料(20 μ l)を実施例15で調製した本発明固相2のウェルに入れ、さらに実施例8で調製した酵素標識抗体液[β -

チン-BSAを使用した本発明固相1を用いた場合と従来のアビジン固定化固相を用いた場合の感度を比較したもの、

第3図は、酵素免疫測定法による試料中の抗原(AFP)の定量において、ビオチン-BSAを使用した本発明固相1を用いた本発明の方法と市販キットの方法とのAFP測定の相関関係を示すグラフ、

第4図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオチン-OAを使用した本発明固相1を用いた場合と従来のアビジン固定化固相を用いた場合の感度を比較したもの、

第5図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオチン-Fab'を使用した本発明固相1を用いた場合と従来のアビジン固定化固相を用いた場合の感度を比較したもの、

第6図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(CEA)の定量結果を示すグラフであって、ビオ

チン-BSAを使用した本発明固相1を用いた場合と従来のアビジン固定化固相を用いた場合の感度を比較したもの、

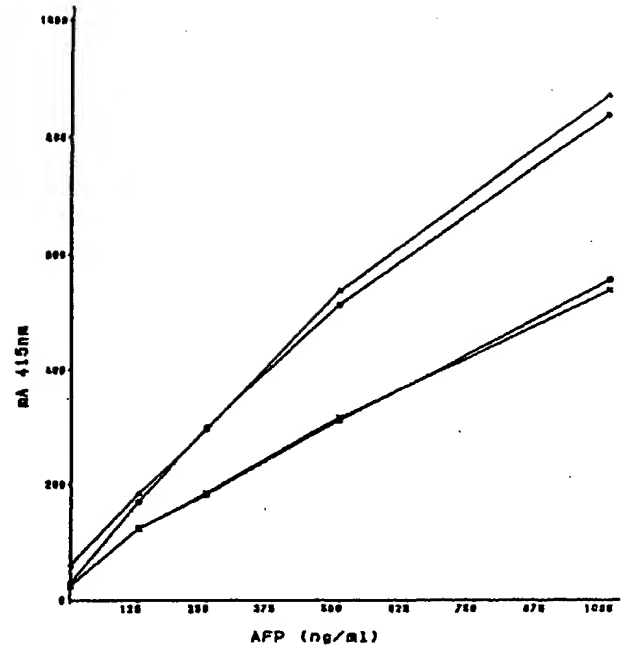
第7図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオチン-BSAを使用した本発明固相1を用い、酵素基質として蛍光基質を用いた場合のグラフ、

第8図は、本発明固相2を用いた酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフ、

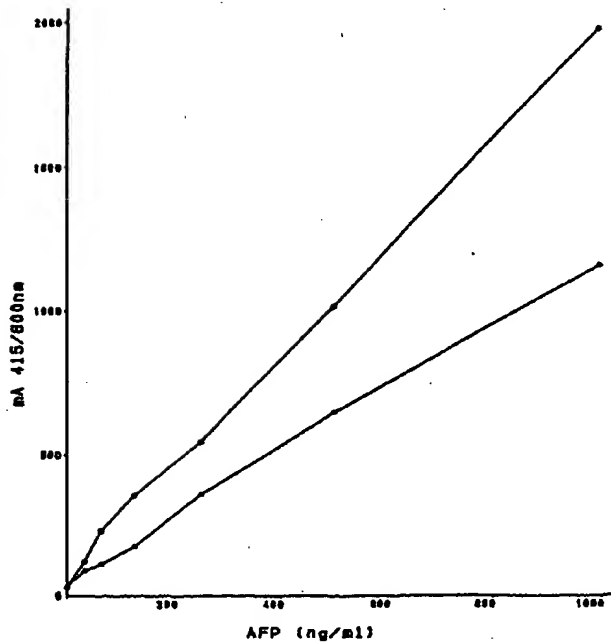
第9図は、ビオチン-Fab'を使用した本発明固相2を用いた酵素免疫測定法により試料中の抗原(CEA)の定量結果を示すグラフ、

第10図は、酵素免疫測定法により試料中の抗原(AFP)の定量結果を示すグラフであって、ビオチン-Fab'を使用した本発明固相2を用いた場合と従来のアビジン固定化固相を用いた場合の感度を比較したものである。

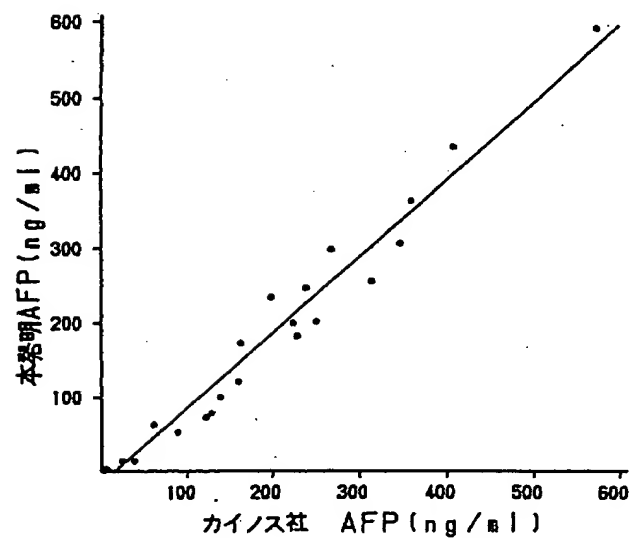
第1図



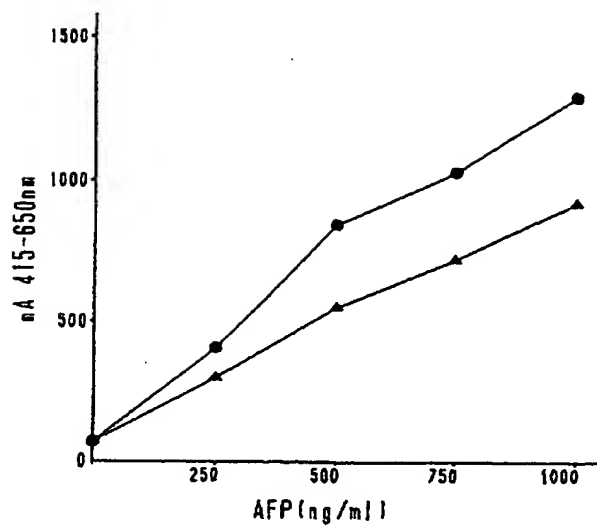
第2図



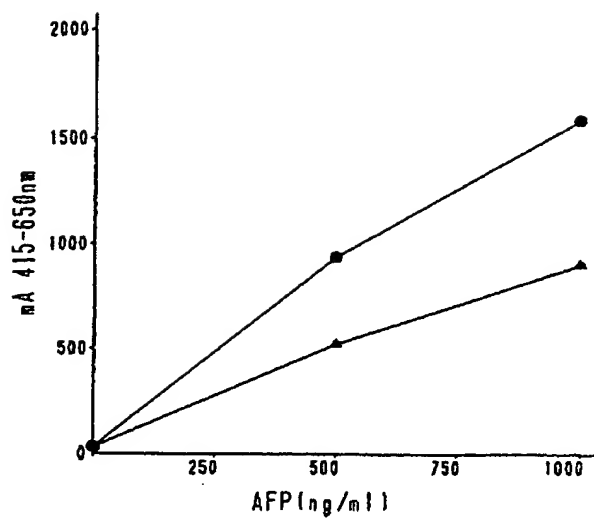
第3図



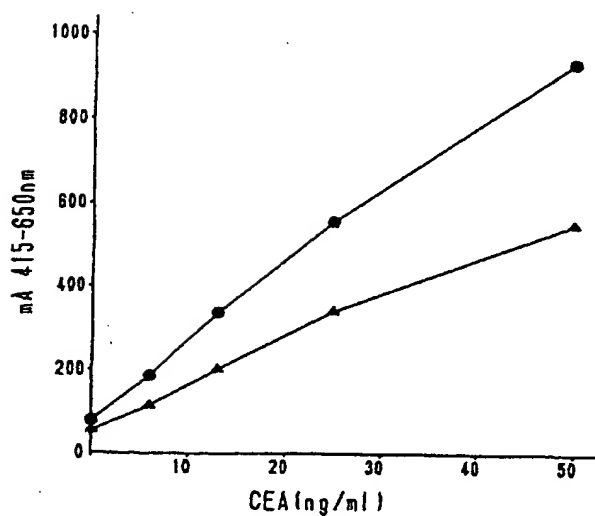
第4図



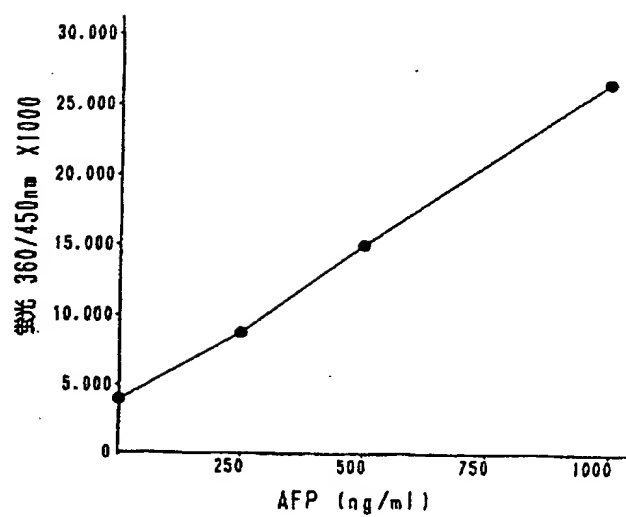
第5図



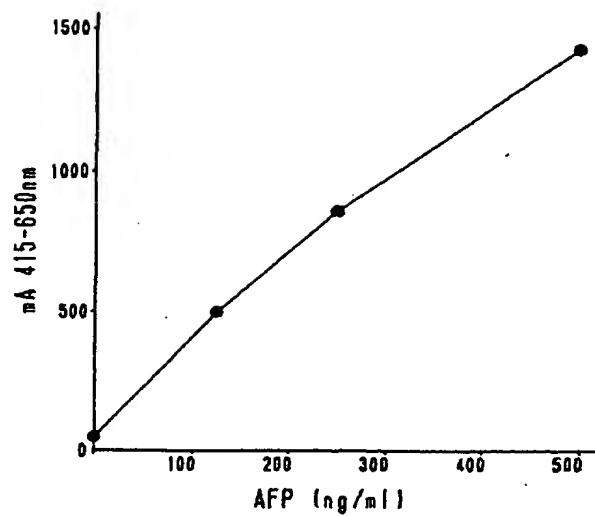
第6図



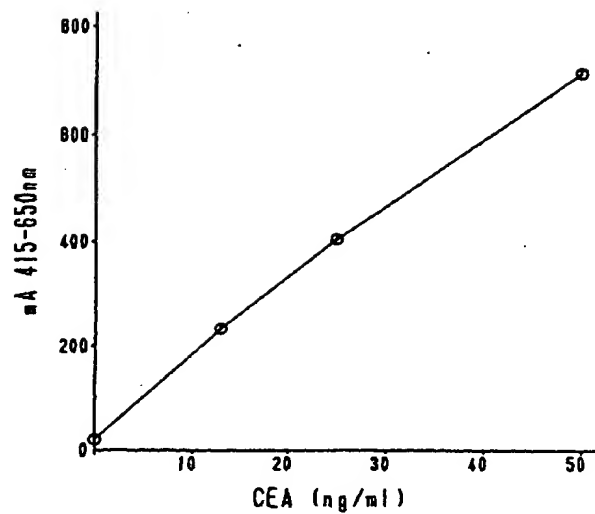
第7図



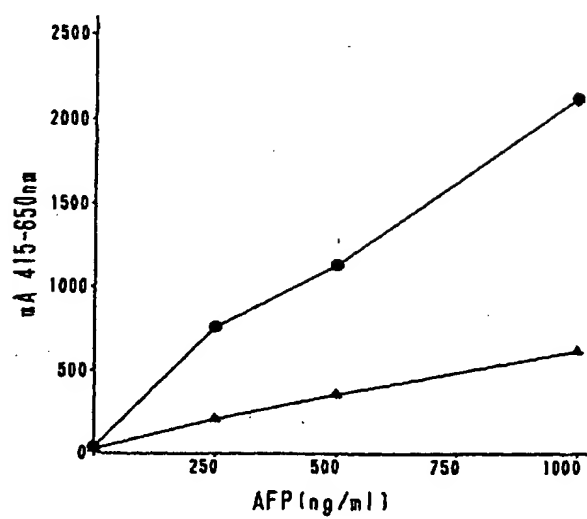
第 8 図



第 9 図



第 10 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

G 01 N 33/563

識別記号

庁内整理番号

7906-2G

②発 明 者 金 田

齊

大阪府高槻市西冠1丁目29-5 C-103

手続補正書

平成 2 年 9 月 23 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第070341号

2. 発明の名称

抗原の定量法およびそれに用いる固相

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 日本顕事株式会社

4. 代 理 人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIBタワー内 電話(06)949-1261

氏名 弁理士 (6214) 青 山 茂

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」、「発明の詳細な説明」の欄および「図面」

7. 補正の内容

(I)明細書の「特許請求の範囲」を別紙のとおり補正する。

(II)同書の「発明の詳細な説明」の欄を下記のとおり補正する。

(1)第17頁下から2行~第18頁4行にある「3-(N-マレイミドブチリル)-ビオシチン(MBB)、3-(N-マレイミドプロピオニル)-ビオシチン、3-(N-マレイミドカプロイル)-ビオシチン、N-ビオチニル-N-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド等」を「3-(N-マレイミドブチリル)ビオシチン(MBB)、3-(N-マレイミドプロピオニル)ビオシチン、3-(N-マレイミドカプロイル)ビオシチン、N-ビオチニル-N-(6-マレイミドヘキサノイル)ヒドラジド等」と訂正する。

(2)第22頁9行にある「BALB/Cマウス」を「BALB/cマウス」と訂正する。

(3)第22頁下から6行にある「ASF培地103」の後に「(味の素(株)製)」を挿入する。



(4)第24頁2行および最下行、第28頁4行および第32頁5行～6行にある「セファデックス-G-25カラム」を「セファデックスG-25カラム」と訂正する。

(5)第28頁最下行にある「オリエンタル」の後に「酵母」を挿入する。

(6)第32頁12行～13行にある「セファローズ-6Bカラム」を「セファローズ6Bカラム」と訂正する。

(7)第33頁下から2行～最下行にある「実施例8」を「実施例9」と訂正する。

(8)第34頁下から6行にある「用いた他は実施例9」を「用い、吸光度を415nmおよび650nm(副波長)で測定した他は実施例9」と訂正する。

(9)第36頁最下行にある「600nm」を「650nm」と訂正する。

(10)第38頁2行にある「ガラクトシド」を「ガラクトビラノシド」と訂正する。

(11)第39頁下から2行および第41頁4行にある「以下、」の後に「吸光度を415nmおよび6

50nm(副波長)で測定した他は」を挿入する。

[Ⅲ]図面の第3図および第9図を別紙のとおり補正する。

別紙

2.特許請求の範囲

(1)固相法による抗原の酵素免疫測定法において、ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチオール基に結合させたビオチン化抗体、酵素標識抗体、および上記ビオチン誘導体と特異的に反応し得るアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を固定化させた固相を用いることを特徴とする方法。

(2)固相が、ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化させたものである請求項(1)記載の方法。

(3)ビオチン化抗体と酵素標識抗体を試料中の測定すべき抗原と反応させてビオチン化抗体/抗原/酵素標識抗体複合体を生成させ、ついでこの複合体を、固相に固定化したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種

と反応させることを特徴とする請求項(1)または(2)記載の方法。

(4)ビオチン化抗体、酵素標識抗体、測定すべき抗原を含有する試料および固相を同時に反応させて行う請求項(1)または(2)記載の方法。

(5)固相法による抗原の酵素免疫測定法において、ビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を介して、固相に固定化させた固相、および酵素標識抗体を用いることを特徴とする方法。

(6)固相が、ビオチン誘導体とビオチン化抗体とに特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化させたものである請求項(5)に記載の方法。

(7)ビオチン化抗体が、ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチオール基に結合させたも

のである請求項(5)または(6)に記載の方法。

(8)酵素標識抗体、測定すべき抗原を含有する試料および固相を同時に反応させて行う請求項(5)、(6)または(7)に記載の方法。

(9)ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に固定化させたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相。

(10)高分子物質がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、イムノグロブリン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン、プルランおよびデキストランよりなる群から選ばれたものである請求項(9)に記載の固相。

(11)ビオチン誘導体を抗体に結合させたビオチン化抗体を、該ビオチン誘導体に特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を介して、固相に固定化させたことを特徴とする酵素免疫測定用固定化固相。

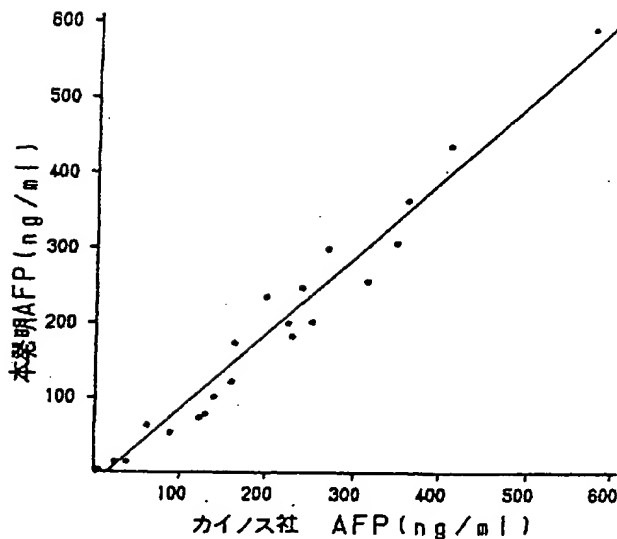
相。

(12)ビオチン誘導体とビオチン化抗体とに特異的に結合したアビジン、ストレプトアビジンおよびそれらの誘導体から選ばれる1種を、該ビオチン誘導体を介して、固相に結合した高分子物質に結合させることにより、固相に結合させたものである請求項(11)に記載の固相。

(13)高分子物質がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、イムノグロブリン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン、プルランおよびデキストランよりなる群から選ばれたものである請求項(12)に記載の固相。

(14)ビオチン化抗体が、ビオチン誘導体を抗体のFab'フラグメントのチオール基に結合させたものである請求項(11)、(12)または(13)に記載の固相。

第3図



第9図

